Société Civile ayant emprunté la forme d'une Société Anonyme

OFFICE PARETTE (FRED MAES)

FONDÉ EN 1898

CONSEILS EN BREVETS, MARQUES, MODELES

PAEPSEM BUSINESS PARK
BOULEVARD PAEPSEM 18E
B-1070 BRUXELLES

TÉLÉPHONE: 02/520 80 00
TÉLÉFAX : 02/527 17 45
TÉLEX : 26370 PARETE

BREVETS D'INVENTION
MARQUES DE FABRIQUE, DESSINS, MODÈLES
EN TOUS PAYS

Mandataire agréé auprès de
l'Office belge
de la Propriété Industrielle
et de
l'Office Européen des Brevets

INFORMATIQUE
INFORMATICA
03 -05- 1993

Ministère des Affaires Economiques,
Office de la Propriété Industrielle,
Rue Demot, 24,

1040 BRUXELLES.

V. REF. -

N. REF. Br/8337.

Bruxelles, le 29 avril 1993.

OFFICE DE LA
PROPRIETE INDUSTRIELLE
29. -4- 1993
ENTREE 271867

Monsieur le Directeur,

Brevet européen N° 0 190 099 du 20 janvier 1986.
Cas BE (EP) 4-15235/=/DEP.

En exécution de la loi belge relative à la partie nationale du brevet susdit, nous sommes chargés par notre mandante, la Société :

- CIBA-GEIGY AG à 4002 BALE,

de déposer, auprès de notre Office, la traduction en langue française de la description de ce brevet.

La délivrance de ce brevet ayant été mentionnée dans le Recueil N° 93/17 du 28 avril 1993, nous avons l'avantage de vous remettre, en annexe, les documents suivants :

- 1' Exemplaire de ladite traduction (22 pages)
- ~~1 Exemplaire des dessins (planches)~~

en vous demandant de bien vouloir nous en accuser réception.

Dans cette attente, et vous en remerciant à l'avance, nous vous prions d'agréer, Monsieur le Directeur, l'assurance de notre considération distinguée.

J. Keuterickx.
OFFICE PARETTE (FRED. MAES).



FD 4.4 (DVC)HPW/DM.

Br/8337.
Cas BE (EP) 4-15235/=/DEP.

TRADUCTION FRANCAISE DE LA SPECIFICATION DU BREVET EUROPEEN
N° 0 190 099 du 20 JANVIER 1986

pour

"Facteurs Polypeptidiques de colostrum"

par

la Société :
CIBA-GEIGY AG,
Klybeckstrasse 141,
CH - 4002 BALE. (Suisse).

Facteurs Polypeptidiques de colostrum

Domaine de l'invention

Cette invention concerne de nouveaux facteurs polypeptidiques issus de colostrum humain, doués d'une affinité pour les anticorps IgE (facteurs de liaison aux IgE) et capables de supprimer la synthèse des anticorps IgE par les lymphocytes (activité de suppression des IgE), des procédés pour isoler ces facteurs et leur utilisation dans le traitement des allergies.

Dans cette description, on emploie les abréviations suivantes :

IgE	- immunoglobuline E
IgG	- immunoglobuline G
IgE-bfs	- facteurs de liaison aux IgE, polypeptides se liant aux anticorps IgE
IgE-SFs	- facteurs suppresseurs d'IgE, polypeptides supprimant la synthèse des anticorps IgE par les lymphocytes B
IgE-PFs	- facteurs potentialisateurs d'IgE, polypeptides potentialisant, à savoir favorisant, la synthèse des anticorps IgE par les lymphocytes B
IgA	- immunoglobuline A
IgM	- immunoglobuline M
GIF	- facteur inhibiteur de glycosylation
GEF	- facteur favorisant la glycosylation
kD	- kilodalton, 1 kD = 1000 g/mole

MM	- masse moléculaire
M	- molaire
E-IgE	- érythrocytes enrobés d'IgE
RPMI 8866	- lignée cellulaire de lymphocyte B exprimant FcR
Tris	- tris(hydroxyméthyl)aminométhane
BSA	- sérum-albumine de bovin
HBSS	- solution saline équilibrée de Hank
IgE-PS	- IgE humaine du myélome PS
E-IgE-RFC	- cellules formant des rosettes avec les érythrocytes enrobés d'IgE
ET	- écart-type

Arrière-plan de l'invention

Les maladies allergiques posent un problème de santé majeur, car un très grand nombre d'individus en sont affectés. Habituellement le traitement est limité à l'utilisation d'antihistamines ou de procédures d'immunisation plus ou moins efficaces. Les médicaments antiallergiques classiques présentent certains inconvénients, en particulier du fait qu'ils provoquent divers effets secondaires chez le patient traité. La procédure d'immunisation est limitée à un ou deux allergènes, alors que la plupart des patients sont sensibles à un grand nombre d'allergènes. De plus, le traitement d'hyposensibilisation n'est ni curatif, ni protecteur. Comme on sait que l'IgE joue un rôle majeur dans les maladies allergiques, on a étudié en détail les mécanismes régulant la production d'IgE au cours des dix dernières années. Ces études ont mis en évidence l'existence dans des modèles animaux de plusieurs facteurs régulant la synthèse de l'IgE. Ces facteurs sont produits par les lymphocytes B et T et ont été nommés : facteur suppresseur d'allergie (SFA), molécules effectrices suppressives (SEM), régulateurs déclenchés par l'IgE issus de cellules B ou T (EIR_B et EIR_T), facteurs de liaison aux IgE (IgE-BFs), facteurs favorisant la glycosylation (GEF) et facteurs inhibiteurs de glycosylation (GIF).

Certains des facteurs sont tout à fait différents les uns des autres pour ce qui est de leurs masses moléculaires et/ou de leurs activités biologiques (un passage en revue figure dans les références 1 et 2).

Le rôle des facteurs de liaison aux IgE (IgE-bfs) dans la régulation non spécifique à un antigène de la production d'anticorps IgE a été étudié en détail chez les animaux (cf. référence 1), où on a montré que les IgE-bfs étaient les molécules effectrices de la régulation isotype spécifique aux IgE. Deux types d'IgE-bfs différant principalement par leurs groupements hydrate de carbone ont été identifiés, à savoir les facteurs suppresseurs d'IgE et les facteurs potentialisateurs d'IgE (IgE-SFs; IgE-PFs); le rapport entre les IgE-SFs et les IgE-PFs détermine la production véritable des anticorps IgE. Les mêmes cellules sont capables de sécréter ou bien des IgE-SFs ou bien des IgE-PFs, selon l'inffluence ou bien des facteurs inhibiteurs de glycosylation ou bien des facteurs favorisant la glycosylation (GIF, GEF) qui sont sécrétés par des sous-populations de lymphocytes T régulatrices distinctes.

Les IgE-bfs humains ont aussi été décrits récemment dans la culture de surnageants de lignées cellulaires T ou B exprimant des récepteurs pour les IgE (3, 4), ainsi que dans le sérum de patients sélectionnés souffrant de dermatite atopique grave (5). Une autre caractérisation biochimique des IgE-bfs de différentes origines est tout à fait nécessaire afin de déterminer s'ils correspondent ou non à des molécules identiques.

On sait déjà que l'allaitement au sein peut altérer la réactivité immunitaire du nouveau-né. Cela a été décrit dans des expérimentations animales (6) et chez l'homme, où on a montré que, par exemple, des bébés nourris au lait de mères sensibles à la tuberculine acquéraient une immunité à médiateur cellulaire à la tuberculine (7, 8). De récentes études prospectives ont aussi indiqué qu'un allaitement au sein ex-

clusif protégeait les nourrissons à haut risque contre les maladies allergiques.

De multiples mécanismes ont été invoqués pour expliquer ces dernières observations : (i) réduction de l'exposition aux antigènes alimentaires étrangers, (ii) protection par les anticorps bloquants IgA du lait spécifiques de divers antigènes alimentaires et d'autres antigènes de l'environnement (9), (iii) protection contre les maladies virales courantes connues pour déclencher un début de maladie allergique (10), et enfin (iv) présence dans le lait humain de facteurs immunorégulateurs capables de moduler le système immunitaire immature du nouveau-né (11). On sait aussi que les nouveaux-nés à haut risque de maladie allergique peuvent être identifiés sur la base des antécédents familiaux et de forts taux d'IgE dans le sérum sanguin du cordon ombilical (12).

L'abondance de documentation sur les observations de l'immunoréactivité des nouveaux-nés nourris au sein peut s'expliquer par la présence, dans le colostrum humain, d'anticorps ou d'idiotypes spécifiques (13, 14), de facteurs immunorégulateurs ou de lymphocytes régulateurs (15, 16). Par conséquent, il est suggéré que l'allaitement au sein peut protéger les nouveaux-nés en leur apportant ou bien des facteurs suppresseurs d'IgE, ou bien d'autres molécules (telles que GIF) ou cellules capables d'interférer avec les lymphocytes des nourrissons impliqués dans la régulation de la production d'anticorps IgE.

On n'a pas jusqu'à présent identifié d'IgE-bfs ayant une activité d'IgE-SF dans le colostrum humain et leur isolement n'est décrit nulle part. De façon surprenante, on a maintenant isolé des IgE-bfs.

<u>But de l'invention</u>

Un premier but de la présente invention est de fournir des IgE-bfs ayant une activité d'IgE-SF à partir du colostrum humain et un procédé pour les isoler.

Un autre but de cette invention est de fournir un procédé pour la prévention et/ou le traitement de l'allergie, qui consiste à administrer les IgE-bfs de la présente invention, et de fournir des compositions pharmaceutiques comprenant lesdits IgE-bfs.

Description détaillée de l'invention

La présente invention concerne des facteurs de liaison aux IgE (IgE-bfs) doués d'une activité suppressive d'IgE (IgE-SF), que l'on peut obtenir, à partir du colostrum humain, sous une forme enrichie.

Les IgE-bfs de la présente invention sont aussi caractérisés de la manière suivante : (1) ce sont des polypeptides possédant une masse moléculaire comprise entre 10 et 25 kilo-daltons (kD), déterminée par chromatographie sur une colonne de Sephadex G75 étalonnée; (2) ils bloquent la liaison des IgE aux cellules porteuses de récepteurs d'IgE, la détermination se faisant, par exemple, par l'inhibition de la formation de rosettes des cellules RPMI 8866 avec E-IgE; (3) ils suppriment, de façon dose-dépendante, la synthèse des IgE sans altérer la production d'IgM par les lymphocytes B de donneurs humains allergiques; (4) ils se lient aux IgE, la détermination se faisant, par exemple, par leur adsorption sur IgE-Sepharose, et ne se lient pas aux IgG, la détermination se faisant, par exemple, par leur absence d'adsorption à IgG-Sepharose; (5) dans les dosages Western blot, les IgE-bfs du colostrum sont identifiés par une bande capable de se lier spécifiquement aux IgE radiomarquées et pas aux IgG, IgM ou IgA marquées; la masse moléculaire apparente des IgE-bfs du colostrum est de 14-16 kD; (6) l'activité biologique des facteurs est résistante à l'ébullition, c'est-à-dire qu'ils se lient toujours à ^{125}I-IgE après 3 min d'ébullition en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium).

Les IgE-bfs de la présente invention sont contenus dans les préparations de colostrum humain en une concentration supérieure à la concentration naturelle. Ils peuvent encore

être mélangés à d'autres polypeptides de colostrum humain de masse moléculaire analogue ou supérieure, par exemple allant jusqu'à environ 45 ou 50 kD, cependant ils sont essentiellement exempts d'autres ingrédients non polypeptidiques de colostrum humain. De préférence, les IgE-bfs sont exempts de polypeptides ayant une masse moléculaire inférieure à 10 et supérieure à 25, en particulier supérieure à 20 kD, et sont essentiellement exempts d'autres ingrédients non polypeptidiques de colostrum humain.

Le procédé de préparation des IgE-bfs de la présente invention est caractérisé par le fait que le colostrum humain est utilisé comme matière première et par le fait que les IgE-bfs sont enrichis jusqu'à une concentration supérieure à la concentration naturelle.

Plus particulièrement, du colostrum humain provenant de volontaires en bonne santé est recueilli durant les deux premiers jours du post-partum, mais on peut aussi utiliser du lait recueilli plus tard. Le colostrum est d'abord clarifié, par exemple par ultracentrifugation, puis acidifié, par exemple avec de l'acide chlorhydrique, jusqu'aux environs de pH 4, afin de précipiter la caséine. Après avoir éliminé la caséine, par exemple par filtration ou centrifugation, on neutralise la préparation clarifiée, par exemple avec du tampon Tris 2M, et on la fait passer à travers un système de filtration, de préférence par étapes, afin d'éliminer les grosses molécules de plus de 50 kD. Par exemple, les pores du premier filtre peuvent avoir un diamètre d'environ 0,45 µm et son filtrat peut ensuite être envoyé à travers un filtre à membrane, par exemple Amicon XM 50, dont le point de coupure désiré est de 50 kD. Après la filtration, la préparation est dialysée contre de l'eau distillée et lyophilisée.

Le lyophilisat est de préférence purifié plus avant par des procédés chromatographiques qui permettent de recueillir les polypeptides ayant une masse moléculaire comprise entre

environ 10 et 25 kD. On peut utiliser n'importe quel procédé chromatographique classique, comme une chromatographie sur gel en plaque de gélose ou une chromatographie sur colonne, par exemple sur Sephadex 675. Le solvant est avantageusement un tampon, par exemple un tampon contenant du chlorure de sodium (par exemple 40mM), du Tris HCl (par exemple 10mM de pH 8,0), un composé tensioactif (par exemple 0,05% de Tween 20), un acide aminé (par exemple 10mM d'acide epsilon-amino-caproïque) et une protéine (par exemple 0,1% de sérum-albumine de bovin BSA). Les fractions contenant le IgE-bf sont celles qui contiennent des polypeptides de masse moléculaire allant d'environ 10 à 25 kD. Elles sont combinées, concentrées, par exemple sous vide, et dialysées, par exemple contre une solution saline équilibrée de Hank (HBSS).

Il convient de comprendre que la présente invention englobe tout autre procédé classique pour isoler les IgE-bfs du colostrum humain.

Les IgE-bfs peuvent être encore purifiés par des procédés classiques, comme par la technique de focalisation isoélectrique ou par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux.

L'activité de liaison aux IgE et de suppression de la synthèse des IgE des IgE-bfs isolés peut être déterminée par des procédés connus dans la technique, par exemple par un dosage d'inhibition des rosettes, par des expériences de chromatographie d'affinité et par des expériences mesurant la suppression du déroulement in vitro de la synthèse des IgE par des lymphocytes issus d'individus allergiques (3).

Les expériences d'adsorption et d'élution sur IgE- et IgG-Sepharose 4B peuvent être considérées comme étant des témoins de spécificité indiquant que l'activité d'inhibition des rosettes du colostrum est effectivement due aux facteurs ayant une affinité pour les IgE.

Les présents résultats indiquent, ce qui est tout particulièrement intéressant, que le colostrum supprime la synthèse in vitro des IgE humaines et que cette suppression a

pour médiateurs les IgE-bfs. De fait, les IgE-bfs et l'activité de suppression des IgE sont tous deux adsorbés spécifiquement sur l'IgE-Sepharose. Les préparations de colostrum n'ont aucun effet sur la synthèse des IgM.

L'invention concerne aussi l'utilisation des nouveaux IgE-bfs de la présente invention pour le traitement ou la prévention d'affections allergiques chez des patients allergiques à toutes sortes d'antigènes, par exemple les pollens, les pellicules de chat, les acariens présents dans la poussière des maisons et analogues. Il pourrait être particulièrement important de traiter les patients à haut risque pendant les périodes critiques, y compris en particulier les nouveaux-nés à haut risque qui ne sont pas nourris au sein. Les IgE-bfs de la présente invention sont administrés par voie entérale, par exemple nasale, rectale ou orale, ou parentérale, par exemple intramusculaire, sous-cutanée ou intraveineuse, habituellement en formes posologiques unitaires, comme en comprimés, en dragées, en ampoules, en flacons, en suppositoires. La quantité d'IgE-bfs de la présente invention à administrer dépend du poids et de l'état général du patient, de la gravité de la maladie, du mode d'administration, et doit être basé sur le jugement du praticien. En général, on peut administrer une dose comprise entre environ 100 et environ 5000 μg par kg de poids corporel et par jour.

L'invention concerne en outre des préparations pharmaceutiques contenant les IgE-bfs de la présente invention, en une quantité efficace comme antiallergique, éventuellement avec des véhicules pharmaceutiquement acceptables classiques, qui conviennent à l'administration orale ou parentérale, à savoir intramusculaire, sous-cutanée ou intrapéritonéale, et qui n'ont pas d'effet néfaste sur les ingrédients actifs.

Les formes galéniques qui conviennent sont les comprimés, les capsules, les flacons contenant une poudre solide

ou les flacons, ampoules et autres contenant des solutions pour perfusion, de préférence des solutions ou des suspensions aqueuses, étant entendu qu'il est possible de les préparer avant l'emploi, par exemple à partir de préparations lyophilisées contenant l'ingrédient actif seul ou avec un véhicule, comme le mannitol, le lactose, le glucose, l'albumine et analogue. La préparation pharmaceutique peut être stérilisée et, le cas échéant, mélangée avec des additifs, par exemple des conservateurs, des stabilisants, des émulsifiants, des solubilisants, des tampons et/ou des sels servant à réguler la pression osmotique. On peut effectuer la stérilisation par filtration stérile à travers des filtres de petite dimension de pores (0,45 µm de diamètre ou moins), après quoi la préparation peut être éventuellement lyophilisée. On peut aussi ajouter des antibiotiques afin d'aider à conserver la stérilité.

Les préparations pharmaceutiques selon la présente invention sont distribuées sous des formes galéniques unitaires, par exemple en ampoules comprenant 1 à 2000 mg d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable par dose unitaire, et environ 1 à 100 mg, de préférence environ 5 à 50 mg, d'ingrédient actif (par exemple une préparation de colostrum lyophilisée contenant l'IgE-bf) par dose unitaire.

L'invention concerne aussi un procédé de production d'une préparation pharmaceutique caractérisé en ce qu'une protéine biologiquement active de la présente invention est mélangée avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Les préparations pharmaceutiques sont produites d'une manière connue en soi, par exemple par des procédés classiques de mélange, dissolution, lyophilisation et analogues, et contiennent d'environ 0,1% à 100%, en particulier d'environ 1% à 50%, des substances actives.

L'utilisation des nouvelles protéines pour le traitement prophylactique et thérapeutique du corps humain forme aussi un objet de la présente invention.

Les exemples suivants décrivent plus en détail la présente invention, sans que l'on doive toutefois les considérer comme la limitant.

Exemple 1

On recueille le colostrum de 15 volontaires en bonne santé non sélectionnés au cours des deux premiers jours du post-partum. Les prélèvements sont immédiatement congelés à -20°C. Cinq regroupements, faits de 3 prélèvements chacun, sont traités en parallèle. Ils sont d'abord clarifiés par ultracentrifugation, puis acidifiés (pH 4,0) avec de l'acide chlorhydrique afin de permettre à la caséine de précipiter, la caséine est retirée et les préparations limpides sont ensuite neutralisées avec du Tris 2M et envoyées à travers un filtre de 0,45 μm. Après une filtration à travers des membranes Amicon XM 50 (coupure de MM 50 kD), les échantillons sont dialysés contre de l'eau distillée et lyophilisés. Ce produit est appelé dans la suite "préparation de colostrum". Dans les dosages par filtration sur gel, on introduit 40 mg de colostrum lyophilisé dissous dans 1,5 ml de tampon (40mM de NaCl, 10mM de Tris HCl, pH 8,0, contenant 0,05% de Tween 20, 10mM d'acide epsilon-aminocaproïque et 0,1% de BSA) sur une colonne de Sephadex G75 (2,5 x 90 cm). Les fractions correspondant à une masse moléculaire comprise entre 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-45 et 45-60 kD sont regroupées, concentrées à 1,5 ml et dialysées contre une solution saline équilibrée de Hank (HBSS).

Les fractions renfermant des polypeptides de masse moléculaire 10-20 kD contiennent l'IgE-bf, comme le montre les dosages immunologiques.

Dosages immunologiques

Les procédés employés sont exactement les mêmes que ceux décrits antérieurement (3). Les IgE-bfs sont decelés par un dosage d'inhibition des rosettes dans lequel des cellules RPMI 8866, connues pour exprimer les récepteurs de surface pour l'IgE, sont mises en rosettes avec des érythro-

cytes de bovins enrobés d'une concentration sous-optimale d'IgE purifiée de myélome PS (don du Dr. K. Ishizaka, Johns Hopkins Univ., Baltimore, MD). Lorsqu'ils sont pré-incubés avec les érythrocytes enrobés d'IgE (E-IgE), les IgE-bfs inhibent la liaison des E-IgE aux cellules RPMI 8866. Tous les dosages sont effectués en double, les tubes sont codés et l'expérimentateur doit ignorer les codes. L'erreur expérimentale est inférieure à 15%. Des expériences de chromatographie d'affinité sont réalisées exactement de la manière indiquée dans les études antérieures (3), à l'aide d'IgE hautement purifiée, comme l'IgE-PS, ou d'IgG polyclonale couplée à la Sepharose 4B (4 mg de protéine/ml de gel). Les filtrats et les éluats sont concentrés jusqu'au volume initial de l'échantillon et immédiatement neutralisés et dialysés contre HBSS.

Les lymphocytes B sont séparés du sang héparinisé de donneurs allergiques par centrifugation sur Ficoll-hypaque; après leur adhérence sur des boîtes de Petri en plastique, les préparations lymphocytaires sont épuisées en cellules formant des rosettes avec des globules rouges de mouton traités à l'AET (bromhydrate de 2-aminoéthylisothio-uronium). Des cultures en double exemplaire contenant 1 à 1,5 x 10^6 cellules dans 1,5 ml de milieu de culture sont réalisées sur des plaques de culture tissulaire Linbro à 24 puits. Certaines cultures reçoivent un supplément de cycloheximide (50 μg/ml) de puromycine (10 μg/ml) afin de déterminer la libération passive de l'IgE préformée dans le surnageant de culture et de calculer la synthèse d'IgE nette dans les cultures dosées. Les cultures sont récoltées au bout de 7 jours d'incubation à 37°C, dans un atmosphère saturée d'eau constituée par 92% d'air et 8% de CO_2. Les immunoglobulines sont dosées dans les surnageants de culture par dosage radioimmunologique en phase solide. Deux anticorps monoclonaux de souris différents sont employés pour la mesure des IgE, à savoir le clone 89 (préparé au laboratoire) et le clone 4.15

(fourni gracieusement par le Dr. A. Saxon, UCLA, Los Angeles, CA). La sensibilité du dosage est de 0,1 ng/ml pour l'IgE, de 0,4 ng/ml pour l'IgM et l'IgA et de 0,8 ng/ml pour l'IgG.

Analyse par Western blot

On incube pendant une nuit 80 µl contenant 100 µg de la préparation de colostrum avec 40 µl de tampon de Laemmli (concentration finale 1% de SDS et 5% de 2-mercaptoéthanol); le mélange est ensuite passé sur SDS-PAGE à 12% (électrophorèse sur gel de polyacrylamide) et transféré sur une membrane de nitrocellulose. Tous les réactifs et le matériel proviennent de Bio-Rad Laboratories et le mode opératoire exact suit le manuel d'instructions de Bio-Rad. Après le transfert, la membrane de nitrocellulose est exposée à des IgE radiomarquées (10^5 cpm/ml; ac. sp. : 2 x 10^4/ng) pendant 24 h, puis autoradiographiée selon le manuel d'instructions.

RESULTATS

Présence d'IgE-bfs dans le colostrum humain

Des regroupements de colostrum, préparés de la manière décrite ci-dessus, sont étudiés à des concentrations finales s'échelonnant de 1 à 1000 µg/ml, pour déterminer leur capacité à bloquer la liaison d'érythrocytes de bovins enrobés d'IgE (E-IgE) à des cellules porteuses de récepteurs d'IgE (RPMI 8866). Chaque préparation de colostrum inhibe de façon significative la formation de rosettes des cellules RPMI 8866 avec E-IgE, aux concentrations optimales de 10 ou 100 µg/ml (tableau I1). Afin de montrer que l'inhibition des rosettes a pour médiateur les IgE-bfs, on adsorbe les fractions de colostrum sur de l'IgE- ou de l'IgG-Sepharose. Les résultats, présentés sur le tableau I2, indiquent que l'activité d'inhibition des rosettes est éliminée par l'absorption sur l'IgE-Sepharose, mais pas sur l'IgG-Sepharose, ce qui suggère que l'inhibition est due aux IgE-bfs présents dans le colostrum. Ceci est confirmé par le fait que l'on peut restaurer l'activité d'inhibition des rosettes par élu-

tion avec un acide (tampon glycine 0,1M, pH 2,8) de l'IgE-Sepharose, mais pas de l'IgG-Sepharose. La masse moléculaire des IgE-bfs est estimée par filtration sur gel (ex. 1) sur une colonne de Sephadex G75 étalonnée. Il ressort du tableau I3 que l'activité de liaison aux IgE est restaurée dans les fractions correspondant à des MM de 10 à 20 kD.

Tableau I : Influence des IgE-bfs sur la liaison des IgE PS aux cellules RPMI 8866

Exp. n°	Echantillon	% cellules formant des rosettes avec E-IgE[a]	% inhibition des rosettes
1	Tampon témoin	70,6 ± 18[b]	-
	Préparation de colostrum (ex. 13), 10 ou 100 µg/ml	48,6 ± 22[c]	31,6
2	Tampon témoin	81,9 ± 4,6[d]	
	Prép. colostrum (100 µg/ml)	56,2 ± 6,1	35,8
	IgE-Sepharose, effluent[e]	76,0 ± 2,6	6,5
	IgE-Sepharose, éluat	59,5 ± 5,1	26,9
	IgG-Sepharose, effluent	55,6 ± 3	36,7
	IgG-Sepharose, éluat	83,7 ± 4	0
3	Tampon témoin	47 ± 7[f]	-
	Prép. colostrum (100 µg/ml)	28 ± 4	41,5
	10-15 kD[g]	31 ± 7	34,1
	15-20 kD	29 ± 4	38,3
	20-25 kD	44 ± 6	6,7
	25-30 kD	52 ± 7	0
	30-45 kD	52 ± 3	0
	≥ 45 kD	51 ± 4	0

[a] E-IgE désigne des érythrocytes de bovin enrobés d'IgE

de PS

b Moyenne ± 1 ET sur 20 déterminations

c $p \leq 0{,}01$ (test de T par paires après transformation angulaire)

d Moyenne ± 1 ET sur 2 expériences

e Les effluents et les éluats sont obtenus de la manière décrite pour le Mab-94-Affigel dans l'exemple 15 et sont utilisés en dilution 1 : 10 après dialyse contre HBSS

f Moyenne ± 1 ET sur 2 expériences

g Exemple 14, fractions regroupées obtenues à partir d'une colonne de Sephadex^ G-75

<u>Activité immunorégulatrice des IgE-bfs de colostrum</u>

Les préparations de colostrum sont ajoutées, à une concentration finale variant de 1 à 1000 µg/ml, à des cultures de lymphocytes B dérivées de 39 donneurs humains allergiques. Au bout d'une semaine de culture en l'absence de colostrum, la sécrétion spontanée d'IgE est supérieure à 400 pg/ml dans 13 cas (plage : 400 à 11 600 pg/ml), tandis que, dans 14 cas, elle est comprise entre 150 et 400 pg/ml et que, dans 12 cas, elle n'est pas décelable. Dans toutes les expériences, sauf une (tableau II), le colostrum supprime, de façon dose-dépendante, la synthèse des IgE sans altérer la production d'IgM. Aux concentrations finales de 10 à 100 µg/ml, le colostrum supprime totalement la synthèse des IgE dans les cultures sécrétant moins de 400 pg/ml d'IgE (résultats non représentés). Dans les mêmes conditions, on note une inhibition de 50% de la synthèse des IgE dans les cultures sécrétant plus de 400 pg/ml (tableau II). L'activité suppressive des IgE du colostrum peut être adsorbée sur de l'IgE-Sepharose 4B, mais pas sur de l'IgG-Sepharose 4B, ce qui indique qu'elle a pour médiateurs les IgE-bfs (tableau III).

Analyse Western blot

Une bande de MM apparente 14-15 kD se lie à l'IgE radiomarquée, mais pas à l'IgG, l'IgA et l'IgM radiomarquées. La spécificité de cette bande est davantage documentée si l'on montre qu'elle n'est pas décelée si le colostrum a été préadsorbé sur l'IgE-Sepharose. On observe le même schéma si le colostrum est porté à ébullition pendant 3 min dans du tampon de Laemmli. On en conclut donc que les IgE-bfs de colostrum sont résistants aux agents réducteurs (comme le 2-mercaptoéthanol) et à l'ébullition.

Tableau II : Influence du colostrum sur la sécrétion spontanée des IgE par des lymphocytes provenant d'individus allergiques

Exp. n°		Cultures avec supplément de -	Colostrum (10 ou 100 µg/ml)	% Suppression
1	IgE	700[a]	0	100
	IgM	30	43	
2	IgE	1750	750	57,2
	IgM	12	9	
3	IgE	650	150	73
	IgM	44	44	
4	IgE	700	100	85,8
	IgM	38	38	
5	IgE	1100	700	46,4
	IgM	27	27	
6	IgE	6900	5800	16
	IgM	30	30.5	
7	IgE	4300	5500	0(-27)
	IgM	49	54	
8	IgE	1300	660	49,3
	IgM	52	41	
9	IgE	7700	5200	32,5
	IgM	62	60	
10	IgE	11.600	5200	53,2
	IgM	110	85	
11	IgE	800	200	75
	IgM	7	5	
12	IgE	4100	2200	46,4
	IgM	45	52	
13	IgE	440	0	100
	IgM	80	76	
IgE (pg/ml):		3273±967	2061±666	56,5±8,3
IgM:		40,5±8,0	38,8±6,2	

a Les résultats sont exprimés en synthèse nette d'IgE (pg/ml) ou d'IgM (ng/ml); valeurs moyennes sur des cultures faites en double. La variation entre les cultures faites en double est inférieure à 20%.

Tableau III : Activité suppressive d'IgE due aux IgE-bfs

Ajouté aux cultures	IgE (pg/ml) Exp. 1	Exp. 2
	1240 ± 240	890 ± 135
Colostrum	550 ± 180	200 ± 50
Colostrum adsorbé sur IgE-Sepharose	1170 ± 290	1150 ± 230
Colostrum adsorbé sur IgG-Sepharose	690 ± 210	380 ± 90

Le colostrum adsorbé et le colostrum non adsorbé sont utilisés à raison de 100 µg/ml; moyenne ± 1 ET de cultures faites en double.

Exemple 2

Préparations pharmaceutiques (administration parentérale)

On dissout 500 mg de préparation de colostrum lyophilisée contenant de l'IgE-bf dans 600 ml de sérum-albumine humaine 5N. La solution résultante est envoyée à travers un filtre bactériologique et la solution filtrée est répartie dans des conditions aseptiques dans 100 fioles contenant chacune 5 mg de composé actif. Les fioles qui conviennent pour l'administration parentérale sont de préférence stockées au froid, par exemple à -20°C.

De la même manière, on peut préparer des fioles à 1 ou 10 mg, avec respectivement 100 ou 1000 mg de la préparation de colostrum ci-dessus.

REFERENCES

1. Ishizaka, K. Regulation of IgE synthesis. Annual Rev. of Immunol. 1984, 2:152.

2. Katz, D.H. and Maceletti, J.F., (1983) Regulation of the IgE antibody system in humans and experimental animals, Progress in Immunology, V, ed. Y. Yamamura and T. Toda, Acad. Press, p. 465.

3. Sarfati, M., Rector, E., Rubio-Trujillo, M., Wong, K., Sehon, A.H. and Delespesse, G. In vitro synthesis of IgE by binding factors secreted by RPMI 8866 lymphoblastoid B cells of human lymphocytes. II. Enhancement of the spontaneous IgE synthesis by IgE. Immunology 1984, 53:197.

4. Huff, T.F. and Ishizaka, K. Formation of IgE-binding factors by human T cell-hybridomas. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1984, 81:1514.

5. Sandberg, K., Provost, T. and Ishizaka, K. IgE-binding factors in atopic eczema. 1983. In Proceed. of XI Int. Congress Allergy Clin. Immunol., MacMillan, p. 105.

6. Beer, A.E., Billingham, R.E. and Head, J.R. Natural transplants tion of leukocytes during suckling. Transplant. Proc. 1975, 7:399.

7. Schlesinger, J.J. and Covelli, H.D. Evidence for transmission of lymphocyte responses to tuberculin by breast-feeding. Lancet 1977, 2:529.

8. Mohr, J.A. The possible induction and/or acquisition of cellular hypersensitivity associated with ingestion of colostrum. J. Pediat. 1973, 82:1002.

9. Cruz, J.R., Garcia, B. and Urrutia, J.J. and Hanson, L.A. Food antibodies in milk from guatemalan women. J. Pediat. 1981, 93:600.

10. Frick, O.L., German, D. and Mills, J. Development of allergy in children. I. Association with virus infection. J. Allergy Clin. Immunol. 1979, 63:228.

11. Crago, S.S. and Mestecky, Immunoinhibitory elements in human colostrum. Surv. Immunol. Res. 1983, 2:164.

12. Kjellman, N.-I.M. and Croner, S. Cord blood IgE determination for allergy prediction. A follow-up to seven years of age in 1,651 children. Annals of Allergy 1984, 53:167.

13. Jarret, E.E.E. and Hau, E. Selective suppression of IgE antibody responsiveness by material influence. Nature (Lond) 1973, 280:45.

14. Roberts, S.A. and Turner, M.W. Specific suppression of rat IgE responses with milk from immunized females and with feeds of serum antibody. Immunology 1983, 48:195.

15. Richie, E.R., Bass, R., Meistrich, M.L. and Dennison, D.K. Distribution of T lymphocytes subsets in human colostrum. J. Immunol. 1982, 129:1116.

16. Parmely, M.J., Beer, A. and Billingham, R.E. In vitro studies on the T-lymphocyte populations of human milk. J. Exp. Med. 1976, 144:358.

R E V E N D I C A T I O N S

1. Facteurs de liaison aux IgE humaines (IgE-bfs) doués d'une activité suppressive d'IgE (IgE-SF), que l'on peut obtenir à partir de colostrum humain sous une forme enrichie, caractérisés en ce que (1) ce sont des polypeptides possédant une masse moléculaire comprise entre 10 et 25 kilo-daltons (kD), déterminée par chromatographie sur une colonne de Sephadex G75 étalonnée; (2) ils bloquent la liaison des IgE aux cellules porteuses de récepteurs d'IgE; (3) ils suppriment, de façon dose-dépendante, la synthèse des IgE sans altérer la production d'IgM par les lymphocyte B de donneurs humains allergiques; (4) ils se lient aux IgE, et ne se lient pas aux IgG; (5) dans les dosages Western blot, les IgE-bfs du colostrum sont identifiés par une bande capable de se lier spécifiquement aux IgE radiomarquées et pas aux IgG, IgM ou IgA marquées; la masse moléculaire apparente des IgE-bfs du colostrum est de 14-16 kD; (6) l'activité biologique des facteurs est résistante à l'ébullition, c'est-à-dire qu'ils se lient toujours à ^{125}I-IgE après 3 min d'ébullition en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium).

2. IgE-bfs selon la revendication 1, dans des préparations de colostrum humain en concentration supérieure à la concentration naturelle.

3. IgE-bfs selon la revendication 1, en mélange avec d'autres polypeptides de colostrum humain de masse moléculaire analogue, inférieure ou supérieure.

4. IgE-bfs selon la revendication 1, pratiquement exempts d'autres polypeptides de colostrum humain possédant une masse moléculaire inférieure à 10 et supérieure à 25, en particulier supérieure à 20 kD, et possédant en particulier une masse moléculaire d'environ 14 à 15 kD.

5. IgE-bfs selon la revendication 1, pratiquement exempts d'ingrédients non polypeptidiques de colostrum humain.

6. Procédé de préparation d'IgE-bfs selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on utilise comme matière première

du colostrum humain et en ce que les IgE-bfs sont enrichis jusqu'à une concentration supérieure à la concentration naturelle.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on utilise du colostrum humain que l'on recueille pendant les deux premiers jours du post-partum.

8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on effectue les étapes suivantes : clarification du colostrum humain, par exemple par ultracentrifugation, acidification, par exemple avec de l'acide chlorhydrique, jusqu'à un pH voisin de 4, élimination de la caséine précipitée, par exemple par filtration ou centrifugation, neutralisation, par exemple avec du tampon Tris 2M, élimination des molécules supérieures à 50 kD, par exemple par passage par étapes à travers divers filtres à membrane, dialyse contre de l'eau et lyophilisation, et éventuellement d'autres étapes de purification.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les autres étapes de purification consistent en une ou plusieurs chromatographies classiques, et/ou une focalisation isoélectrique et/ou un isolement par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux.

10. IgE-bfs selon la revendication 1, à utiliser dans un procédé de traitement thérapeutique ou prophylactique d'affections allergiques chez des patients allergiques.

11. Préparations pharmaceutiques comprenant des IgE-bfs selon la revendication 1.